

乳腺癌研究进展专题

• 综述 •

乳腺癌干细胞相关研究进展

张宁 黄韬

干细胞是一类具有自我更新和多项分化潜能的原始细胞。在一定条件下,它可以分化成多种功能细胞。肿瘤干细胞是肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的细胞,与肿瘤进展、耐药、复发、转移等关系密切。肿瘤干细胞在肿瘤细胞中的比例一般不到 5%,却可能是癌症演进的关键细胞。直到 2003 年^[1],人类乳腺癌干细胞才被发现和鉴定,这是进入 21 世纪后,乳腺癌基础研究领域最重要的发现之一。

1 乳腺癌干细胞概述

1.1 干细胞与乳腺终末导管的发育

作为女性第二性征和哺育后代的重要器官,乳腺组织有着自身独特的发育特点。与体内其他大多数器官在胚胎期和婴幼儿期就已经发育成熟不同,乳腺组织的发育主要始于青春期并受体内性激素的调控,在妊娠哺乳期乳腺组织还会再次出现发育和复旧的改变,成年女性的乳腺组织也会随着月经周期和体内性激素水平的波动发生周而复始的扩大与复旧变化^[2]。成年女性的乳腺组织主要由乳腺导管-小叶结构组成,其中存在同一干细胞来源的两种不同的细胞系——腔上皮细胞和肌上皮细胞^[2-3];此外,在乳腺组织内的常规细胞更新中,替换细胞也只能从腔上皮层脱落进入导管的管腔内^[3]。这些特点初步显示了乳腺组织中干细胞存在的必要性(图 1)^[4]。

1.2 乳腺癌干细胞起源学说

正常组织干细胞与肿瘤干细胞存在很多共同点^[1]。迄今肿瘤干细胞起源于何种细胞尚未有定论,目前有两种假说^[1,5]:(1)一些已经开始分化的原始细胞或成熟细胞可能在损伤或致癌因素的作用下,在癌变以前重新获得自我更新能力,经历突变形形成肿瘤干细胞。(2)由于正常干细胞已经存在被激活的自我更新机制,获得较少突变即有可能恶性转化,而且干细胞存活时间较长,有更多的突变机会形成肿瘤干细胞;Wnt 信号途径失调^[6-7]等诸多信号转导途径与乳腺组织干细胞自我更新、增生及分化失调而致恶性转化有关。

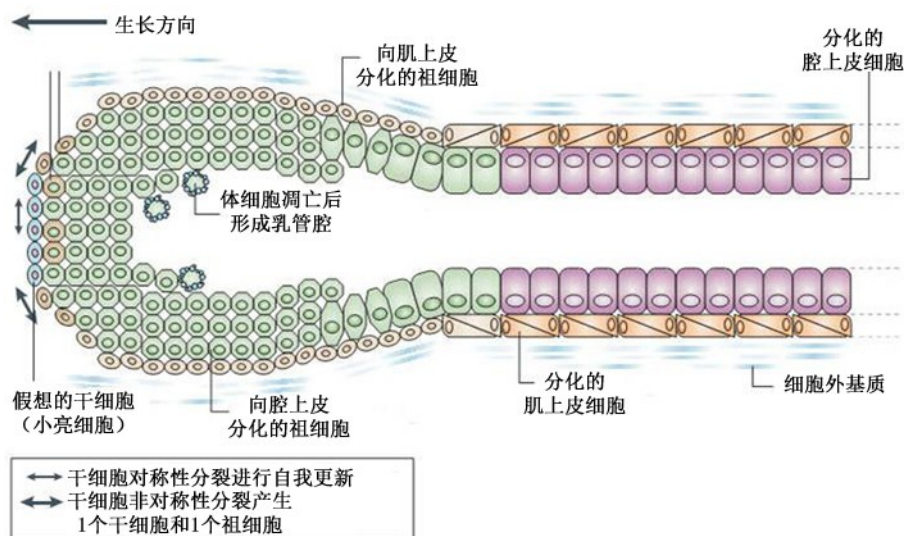


图 1 乳腺的终末导管结构与发育^[4]

1.3 乳腺癌干细胞与药物耐受

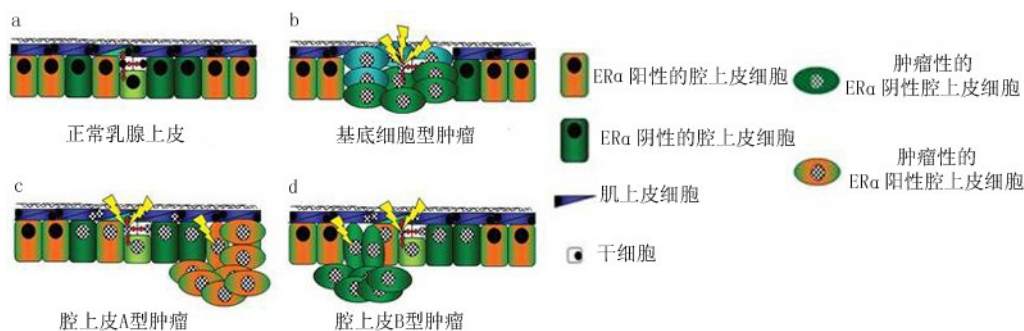
与普通干细胞一样,肿瘤干细胞较之分化细胞对化疗等多项治疗更具抵抗能力。理论上,一种治疗方案杀死的大部分只是肿瘤分化细胞而肿瘤干细胞基本完好无损。已有研究显示,源于 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞系的 $CD44^{+}CD24^{-/low}$ 细胞对临床相应剂量的放射治疗和内分泌治疗都表现出更强的抵抗能力^[8-9]。同时,肿瘤干细胞高表达三磷酸腺苷结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transponer, ABC 转运蛋白)以及肿瘤干细胞常伴有 DNA 修复机制的缺陷,使得肿瘤干细胞更加容易逃逸化疗,成为耐药细胞^[10-11]。明确肿瘤组织中干细胞和分化细胞的比例将有助于预后判断,乳腺癌组织中干细胞含量增加意味着局部和远处复发转移风险升高^[12-13]。

1.4 乳腺癌干细胞与分子亚型

最近采用微阵列技术分析的新方法,依据特异性 mRNA 的表达水平可以把乳腺癌重新划分为至少 5 种不同的病理分子类型:腔上皮 A 型(肿瘤细胞高表达 ER)、腔上皮 B 型(肿瘤细胞低表达 ER)、HER-2 型、基底细胞型和类正常型(图 2)。根据肿瘤的干细胞起源学说,正常乳腺细胞发生突变形成乳腺癌干细胞后不但会导致乳腺癌的发生,而且不同类型的突变会导致不同类型的乳腺癌(图 2)^[14]。对肿瘤病理分子类型和起源认识的加深不仅可以使医师进一步明晰不同类型乳腺癌或特殊类型乳腺癌^[15]的临床病理特征和分子学特点,还可以帮助医师更好的了解不同患者的乳腺癌在生物学特性、治疗反应性及预后存在差异的原因,并制定更好的个体化治疗方案。

2 乳腺癌干细胞标志

现阶段,利用细胞表面分子表型的差异和流式细胞分选的方法,使得快速分

图2 不同类型乳腺癌的起源假设^[14]

离、纯化干细胞成为可能,这极大地推动了肿瘤干细胞的研究,也使得为肿瘤干细胞的存在提供更直接的证据成为可能。

2.1 乳腺癌干细胞的经典标志 $CD44^{+}CD24^{-}$

2003年,Al Hajj等^[1]首次用流式细胞仪从9例人乳腺癌中分离出肿瘤细胞,分选后接种于NOD/SCID小鼠。根据致瘤能力的不同,先筛选出 $CD44^{+}$ 和 $CD24^{-}$ 这2个标志抗原,再通过各种抗原之间组合,筛选出致瘤力最强的标志。其中, $ESA^{+}CD44^{-}CD24^{-/low}$ 细胞亚群最低仅100个肿瘤细胞即可使NOD/SCID小鼠致瘤,并且从重建的乳腺癌组织中分离出的 $ESA^{+}CD44^{-}CD24^{-/low}$ 细胞,还能再次在NOD/SCID鼠体内重建出乳腺癌组织^[1]。

2.2 SP(side population)细胞

有研究者认为肿瘤干细胞处于相对静止期,膜表面高表达ABC转运蛋白,可以将荧光染料Hoechst33342泵出细胞外而不被染色,其他细胞却不具有此功能^[16-17]。利用荧光染色结合流式细胞分选,将不被染色、没有荧光的细胞分选出来,称为SP细胞,其中富含肿瘤干细胞。SP细胞具有悬浮培养状态下生长形成细胞微球的能力^[18]。这种分离鉴定乳腺癌干细胞的方法问世于1996年^[16]。目前在乳腺癌细胞系的研究中还有应用^[19-20]。

2.3 乳腺癌干细胞标志物乙醛脱氢酶1(ALDH1)

2007年,Ginestier等^[21]发现了一个乳腺癌干细胞的新标志物——ALDH1。研究者采用一种称为ALDEFLUOR的试剂来标记、检测并分选ALDH1活性高的细胞。结果表明,在乳腺组织的正常细胞及癌细胞中,只有ALDEFLUOR阳性细胞才具有类似于干细胞的特性。同时,研究者还对分选的细胞能否形成乳腺肿瘤进行了实验。结果显示,仅ALDH1阳性细胞可形成肿瘤,即使只用500个阳性细胞也会形成肿瘤;但5万个ALDH1阴性细胞也不会形成肿瘤。而ALDH1与 $CD44^{+}CD24^{-}$ 同时表达的细胞亚群,最少20个细胞即可致瘤,是迄今为止最精确的标志!另外,研究者还检测了577份乳腺癌组织标本,结果发现:19%~30%的肿瘤表达ALDH1;表达ALDH1

阳性肿瘤患者的预后最差,其总体生存率较低,发生转移的可能性是 ALDH1 阴性肿瘤患者的 1.76 倍。这说明,不同于其他乳腺癌干细胞标志,ALHD1 还与乳腺癌的预后相关,具备潜在的预后判断价值。

2.4 乳腺癌干细胞标志研究尚存的问题

从目前的研究结果看,并非 100% 的乳腺癌都含有表达现有干细胞标志的细胞亚群,那么,不含有表达现已认知标志物的肿瘤干细胞的乳腺癌如何起源? 是否还有其他类型的标志物或肿瘤干细胞? 在乳腺癌进展过程中,由于遗传不稳定性和表观遗传学变化,这些干细胞表型能否丢失或获得? 其生物学意义又何在? 这些都是乳腺癌干细胞标志研究中尚存在且值得进一步研究的问题。

3 乳腺干细胞及乳腺癌干细胞的自我更新调控机制

目前已知的参与乳腺干细胞自我更新调控的信号通路主要包括 Wnt、Hedgehog 和 Notch 信号通路(图 3)^[22]。这 3 个信号途径的异常不但会影响乳腺干细胞的正常自我更新和乳腺发育,还会引起乳腺干细胞的恶性转化和肿瘤发生,并参与乳腺癌干细胞自我更新的调控^[3-23]。

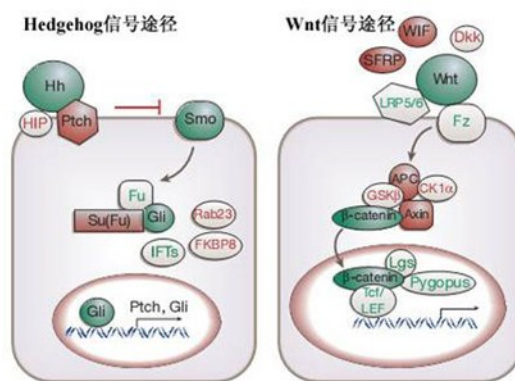


图 3 Hedgehog 信号途径和 Wnt 信号途径^[22]

来自 MMTV-Wnt1 小鼠乳腺内的 $CD24^{+}CD29^{high}$ 细胞在移植后 5 周时也会表现出过度增生现象;在 MMTV-Wnt1 小鼠处于癌前期过度增生的乳腺组织内,乳腺干细胞(mammary stem cells, MSCs)的含量增加了约 6.4 倍^[2]。这一研究提示:Wnt1 的活化能促进 MSCs 的自我更新并有着重要的调控影响,对转基因鼠用 keratin-6 和 Sca-1 标记后也表明 MSCs 是乳腺细胞发生恶性转化的主要靶细胞^[24]。Hedgehog 和 Notch 信号途径都对乳腺干细胞的自我更新、乳腺微球形成及乳腺组织重建有着重要影响^[23,25]。2008 年 10 月,来自澳大利亚的 Bouras 等^[26]科学家称,他们发现了 Notch 信号途径在调控乳腺干细胞功能和乳腺上皮层中所发挥的作用,不当的 Notch 激活将促进

luminal 祖细胞的自我更新和转化。敲除 MSCs 富集细胞群中的规范 Notch 效应子 Cbf-1, 将导致干细胞活性增强, 并产生异常的结构^[26]。这一发现表明, 内生的 Notch 信号对限制 MSCs 扩展起到一定的作用。该研究同时还发现, 在导管上皮(ductal luminal epithelium)中 Notch 被预先激活, 表明 Notch 信号能特异性针对 luminal 祖细胞。luminal 祖细胞的扩展将导致增生肥大以及肿瘤的发生。

肿瘤的复发、侵袭、转移及耐药等恶性表型都与肿瘤干细胞有关。以肿瘤干细胞为治疗靶点, 对传统的治疗方式提出了巨大的挑战。随着对乳腺癌干细胞基因表达调控和分子靶向药物作用机制的进一步研究, 有学者发现分子靶向药物赫赛汀(Herceptin)^[27]、拉帕替尼(Lapatinib)^[28]等亦可通过靶向乳腺癌干细胞发挥治疗作用。

4 结语

肿瘤干细胞起源于干细胞的异常突变, 而肿瘤又起源于肿瘤干细胞的自我更新和分化。由于干细胞的异常突变可能和细胞所处的微环境有关, 那么也许可以设法通过改变微环境来诱导癌细胞向正常细胞分化, 因此, 如何靶向性诱导肿瘤干细胞的分化是今后研究的方向。同时, 肿瘤干细胞还具有和正常干细胞相同的调控自我更新的信号传导通路。在通过抑制这些信号通路来杀伤肿瘤干细胞的同时, 是否会抑制正常干细胞而发生严重的不良反应还有待探讨。微阵列分析已经用于病理学标准无法区分的肿瘤亚型。微阵列分析可以比较正常乳腺干细胞、乳腺肿瘤干细胞、一般肿瘤细胞及正常乳腺组织基因表达谱的不同。在此基础上将乳腺癌干细胞或其重要调控环节作为治疗靶标, 研究开发新的靶向治疗和个体化治疗方法和药物, 根据干细胞分子特性区分肿瘤亚型并用于预后判断和疗效预测, 将会为乳腺癌的治疗带来革命性的进步。

【关键词】 乳腺癌干细胞; 干细胞标志; 信号调控; 靶向治疗

【中图分类号】 R737.9 【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Al Hajj M, Wicha MS, Benito HA, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:3983-3988.
- [2] Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, 2006, 439:84-88.
- [3] Woodward WA, Chen MS, Behbod F, et al. On mammary stem cells. *J Cell Sci*, 2005, 118:3585-3594.
- [4] Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3:832-844.
- [5] Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, et al. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:11 842-11 849.
- [6] Willert K, Brown JD, Danenberg E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*,

2003;423:448-452.

- [7] Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signaling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003, 423:409-414.
- [8] Cariati M, Naderi A, Brown JP, et al. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF-7 breast cancer cell line. *Int J Cancer*, 2008, 122:298-304.
- [9] Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24 (– / low) / CD44 + breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98:1777-1785.
- [10] Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45:872-877.
- [11] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5:275-284.
- [12] Abraham BK, Fritz P, McClellan M, et al. Prevalence of CD44+ / CD24– / low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*, 2005, 11:1154-1159.
- [13] Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 2007, 11:259-273.
- [14] Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*, 2003, 36:59-72.
- [15] 齐晓伟. 三阴性乳腺癌研究进展. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2008, 2:612-617.
- [16] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 1996, 183:1797-1806.
- [17] Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, et al. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial / basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res*, 2006, 8:R7.
- [18] Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, et al. Functional and molecular characterization of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*, 2003, 5:R1-R8.
- [19] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 2001, 7:1028-1034.
- [20] Zhou J, Wulfschuhle J, Zhang H, et al. Activation of the PTEN/mTOR/STAT 3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:16 158-16 163.
- [21] Ginestier C, Hur MH, Charafe Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 2007, 1:555-567.
- [22] Philip AB, Sunil SK, David MB. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 2004, 432:324-331.
- [23] Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res*, 2005, 7:86-95.
- [24] Li Y, Welm B, Podsypanina K, et al. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:15 853-15 858.
- [25] Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, et al. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res*, 2004, 6:R605-R615.
- [26] Bouras T, Pal B, Vaillant F, et al. Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment. *Cell Stem Cell*, 2008, 3:429-441.
- [27] Korkaya H, Paulson A, Iovino F, et al. HER-2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*, 2008, 27:6120-6130.
- [28] Bedard PL, Cardoso F, Piccart Gebhart MJ. Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2009, 14:55-66.

(收稿日期:2009-02-16)

(本文编辑:陈莉)

张宁, 黄韬. 乳腺癌干细胞相关研究进展[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2010, 4(6):649-654.